

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



Rec'd PCT/PTO

07 APR 2005



(43) 国際公開日  
2004年4月22日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/033610 A1

(51) 国際特許分類: C11D 3/386, 3/395, C12N 9/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012143

(22) 国際出願日: 2003年9月24日 (24.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-294528 2002年10月8日 (08.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井化学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒105-7117 東京都港区東新橋一丁目5番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森田 みゆき (MORITA, Miyuki) [JP/JP]; 〒002-8502 北海道札幌市北区あいの里5-3-1 北海道教育大学札幌校内 Hokkaido (JP). 伊藤 潔 (ITO, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒299-0265 千葉県袖ヶ浦市長浦580-32 三井化学株式会社内 Chiba (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

— USのための発明者である旨の申立て (規則4.17(iv))

添付公開書類:

— 国際調査報告書  
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正審査の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF USING RICE-ORIGIN PEROXIDASE

(54) 発明の名称: イネ由来ペルオキシダーゼの利用法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of using rice-origin peroxidase, in particular rice chaff-origin peroxidase, having a high reactivity at a high temperature and a high stability. Using the rice-origin peroxidase, coloring matters (dyes, etc.) in a washing liquor are degraded (i.e., discoloring and bleaching). More specifically speaking, migration of a fiber dye from a dyed fabric to another fabric is prevented in case of washing or rinsing the dyed fabric together with another fabric in a single washing liquor. Also, a fiber dye in a solution or a dispersion is bleached. By effectively preventing the migration of a dye during washing or rinsing as described above, an improved method of bleaching a fiber dye in a solution or a dispersion and a composition for preventing dye migration and bleaching can be provided.

(57) 要約: 本発明は高温での反応性並びに安定性に優れているイネ由来ペルオキシダーゼ、特に、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの利用方法を提供する。イネ由来ペルオキシダーゼを用いて洗液中の着色物質(染料など)の分解(脱色・漂白)する。より具体的には、染色布ともう1つの布を同一の洗液中で一緒に洗った場合、または、すすぐ場合の染色布からもう1つの布への繊維染料の移染を阻害する。また、溶液または分散液中の繊維染料を漂白する。本発明により洗濯又はすすぎにおいて優れた染料の移動防止が可能になり、溶液又は分散液中の繊維染料を漂白するより優れた方法、更には染料の移動防止、漂白用の組成物が提供される。

WO 2004/033610 A1

## 明細書

## イネ由来ペルオキシダーゼの利用法

## 技術分野

本発明は、高温での反応性並びに安定性に優れているイネ由来ペルオキシダーゼ、より具体的には、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの利用方法に関する。

より特定の言くと、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼを用いた溶液中の着色物質（染料など）の分解（脱色・漂白）方法および組成物の提供に関する。

すなわち、本発明は、洗液中で染色された布を含む複数の布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合において、染色された一方の布から他の布への繊維染料の移行を防止する方法（以下、染料移動阻止方法と呼ぶ）に関する。さらに、本発明は、溶液または分散液中の繊維染料を漂白する方法に関する。また、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼを含有する洗剤組成物もしくは漂白剤組成物に関する。

## 背景技術

ペルオキシダーゼ（E. C. 1. 1. 1. 7）は、植物組織、動物組織、血液等に広く分布しており、さらに、いくつかの微生物も同酵素を分泌することが以前より確認されている。該酵素は、過酸化水素による基質（電子又は水素供与体）の酸化触媒として作用する酵素である。尚、ペルオキシダーゼは、補欠分子族並びに反応形式の違いによりいくつかのタイプに分類されるが、工業的には、補欠分子族としてヘムを含んでいるヘム型ペルオキシダーゼの利用が最もよく知られている。

次に上述のヘム型ペルオキシダーゼについて説明する。ヘム型ペルオキシダーゼは、3価の鉄イオンを含むヘム蛋白質であり、過酸化水素や有機過酸化物の存在下で種々の化合物の酸化を触媒する酵素である。その作用機作については、下のステップ1～ステップ3のように、過酸化物の存在下で種々の化合物の酸化的な脱水素反応を触媒すると説明されている。

ステップ1：ペルオキシダーゼ +  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$  コンプレックス I

ステップ2：コンプレックス I + AH（還元型供与体）

$\rightarrow$  コンプレックス I I + A（酸化型供与体）

ステップ3：コンプレックス I I + AH  $\rightarrow$  ペルオキシダーゼ + A +  $2\text{H}_2\text{O}$

ヘム型ペルオキシダーゼの代表例としては、例えば西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、大豆由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌス・シネレウス (*Corprinus cinerus*) 由来ペルオキシダーゼ（例えば、特公平03-1949号公報参照）等がよく知られている。

ペルオキシダーゼの産業上の利用については、幅広い提案が既になされているが、その中には、各種有機化合物の分解プロセスに使用することも含まれる。たとえば、製紙用パルプの製造プロセスでの利用や繊維染料の漂白・分解を目的とする利用等である。尚、上述の作用機作に基づき、これらの公知の方法においては、ペルオキシダーゼは、通常過酸化水素または現場において過酸化水素を発生しうる化合物や酵素系と一緒に使用される。

繊維染料の漂白・分解という観点から見た場合、ペルオキシダーゼは、染料移動阻止剤および繊維染料の漂白剤としての利用が提案されている。ここで、

“染料移動阻止”とは、例えば特許掲載第2801398号公報に記載されたような布の洗浄中に染色された布から他の布への繊維染料の移動阻止からなるプロセスであるが、この染料移動の問題は、染料が洗濯の間に滲出する暗色の布と白色または淡色布と一緒に洗濯する場合に重要である。さらに、溶液または分散液中の繊維染料に対するペルオキシダーゼの漂白作用に基づいて、該酵素が繊維工業からの排水処理に有効であると期待されている。また、ペルオキシダーゼのこれら能力は、過酸化水素と共に、活性化剤と称される染料以外の

被酸化性基質、と組み合わせると、特に顕著になることも知られている。

残念ながら、自然環境中における上記ペルオキシダーゼの活性レベルは、比較的自然的な洗浄や排水処理環境中で維持されないことがしばしばある。特に、反応性（反応速度）、熱安定性、pH安定性、酸化安定性および基質特異性等のペルオキシダーゼが有する種々の特性が、該酵素の自然環境外での利用にとって必ずしも最適とは限らない。実際に、染料移動阻止および漂白に関して有効なペルオキシダーゼとして、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、大豆由来ペルオキシダーゼ、または、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼのような細菌・酵母・糸状菌のような微生物により産生されるペルオキシダーゼが既に提案されているが、いずれも実用的な活性レベルには達していない。特に、繊維染料の移動が起り易いのは、40℃以上で洗浄を行った場合であるが、この温度において優れた反応性と安定性を示すペルオキシダーゼは、知られていない。

また、造粒化等の洗剤組成物としての加工時、並びに、加工後の保存時においても、優れた安定性を示すペルオキシダーゼは、知られていない。

今日の遺伝子工学の進歩により、タンパク質のアミノ酸配列中における特定のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換させることが可能であり、かつ、比較的容易になっている。そして、置換されるアミノ酸残基の位置、置換されたアミノ酸残基の化学的な性質や物理的な大きさ等に応じて、元の酵素の性能を様々な程度に変化させうるし、場合によっては、元の酵素を不活化させることもすらある。ペルオキシダーゼについても、そのようなアプローチは可能であり、たとえば、特表平9-503664号公報では、洗浄環境中での効力を増加させたペルオキシダーゼを取得するという目的で、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼのアミノ酸配列を変化させて、その性能を改善することが試みられているが、残念ながら、十分な能力を獲得するには至っていない。

また、ペルオキシダーゼを染料移動阻止や排水処理で利用するためには、ペルオキシダーゼ自体が低コストで製造される必要がある。すなわち、ペルオキシダーゼが多量に含有されており、入手し易く、豊富に存在し、かつ、それ自

体が安価な材料からペルオキシダーゼを分離・精製・回収するか、細菌・酵母・カビなどの微生物に該酵素を効率よく生産させることが必須である。

先に述べたように、ペルオキシダーゼは植物（組織）に広く存在しているので、その種類を問わず植物（組織）からの抽出が考えられる。その代表例として西洋ワサビがよく知られているが、西洋ワサビは、ペルオキシダーゼは多量に含有されているものの、入手し易く、豊富に存在し、かつ、それ自体が安価な材料とは言い難い。

また、近年の遺伝子工学的な手法の進歩により、細菌・酵母・糸状菌などの微生物にペルオキシダーゼを効率よく生産させることが可能になっている。その場合、該酵素生産時における宿主微生物の生育環境を厳密に制御することが、高い生産効率の維持並びに遺伝子組換え生物の封じ込めという観点から必須である。しかしながら、生育環境を厳密に制御するためには、高度に密閉され、かつ、殺菌が可能な専用の装置・機器やそれを格納するための専用施設が必要となるため、一般的には、低コストで製造することは必ずしも容易ではない。

イネにもペルオキシダーゼが含まれており、特にイネモミガラ中に比較的多量のペルオキシダーゼが含まれていることが既に報告されている（日本作物学会東海支部研究発表梗概 第59巻・第6頁）。また、その精製方法（特公平5-22510号公報）、並びに、植物成長促進剤としての利用方法（特公平7-91169号公報）についての提案が既になされているが、染料移動阻止や漂白に関する利用についての報告はなされていない。

#### 発明の開示

以上の状況に鑑み、本発明の課題は、従来のペルオキシダーゼにはないより非自然な条件で活性の発現が可能なペルオキシダーゼを見出し、これを利用する方法を提供する事にある。

そして、本発明の目的は、洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の染料の漂白を伴う繊維工業等での排水処理に対

する有効な活性レベルに優れ、かつ、安価なペルオキシダーゼの利用を提供することである。

イネモミガラは、日本においては、年間約200万トン発生しており、その3割近くが焼却ないし廃棄されている（参考文献：バイオマス・エネルギー・環境 アイピーシー）。すなわち、イネモミガラは、ペルオキシダーゼが多量に含有されており、入手し易く、豊富に存在し、かつ、それ自体が安価な材料である。

驚くべきことに、本発明者らは、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、先に例示した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、大豆由来ペルオキシダーゼ、および、コルブリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼと比較して、高温での反応性並びに安定性に優れていることを見出し、よって、染料移動阻止および漂白に関して有効な活性レベルを維持できるペルオキシダーゼであることを確認し、本発明を完成するに至った。また、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは染色された布自体には何らの明らかな色分解を起こさないという重要な利点も併せて有していた。

すなわち、高温での反応性並びに安定性を示すイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを利用することで、室温から高温までの幅広い温度域での繊維染料の移動阻止効果および漂白効果が期待できると共に、造粒化等の洗剤組成物としての加工時、並びに、加工後の保存時においても、優れた安定性を期待することができる。

即ち、本発明は以下のとおりである。

〔1〕 洗液中で染色された布を含む複数の布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合において、染色された一方の布から他の布への繊維染料の移行を防止する方法であって、該洗液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。

〔2〕 溶液または分散液中の繊維染料を漂白する方法であって、前記溶液または分散液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。

〔３〕 イネ由来ペルオキシダーゼが、耐熱性のイネ由来ペルオキシダーゼであることを特徴とする〔１〕または〔２〕のいずれか１項に記載の方法。

〔４〕 イネ由来ペルオキシダーゼが、イネモミガラ由来のペルオキシダーゼであることを特徴とする〔１〕から〔３〕のいずれか１項に記載の方法。

〔５〕 過酸化水素が、過酸化水素前駆体、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤と過酸化水素前駆体との共存系、および過酸化水素を発生しうる酵素系のうちの少なくともどれか一つの手段により供給されることを特徴とする請求の〔１〕から〔４〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６〕 過酸化水素前駆体が過ホウ酸塩または過炭酸塩である〔５〕に記載の方法。

〔７〕 活性化剤の存在下において実施することを特徴とする〔１〕から〔６〕のいずれか１項に記載の方法。

〔８〕 界面活性剤の存在下において実施することを特徴とする〔１〕から〔７〕のいずれか１項に記載の方法。

〔９〕 繊維染料が合成染料、天然染料又は天然同一性染料である〔１〕から〔８〕のいずれか１項に記載の方法。

〔１０〕 イネ由来ペルオキシダーゼを含んでいる組成物。

〔１１〕 洗剤組成物もしくは漂白剤組成物であることを特徴とする〔１０〕に記載の組成物。

〔１２〕 過酸化水素、一種類以上の過酸化水素前駆体、および、過酸化水素を発生せしめることのできる一種類以上の酵素系のうちの少なくともどれか一つを含んでいることを特徴とする〔１０〕または〔１１〕のいずれか一項に記載の組成物。

〔１３〕 イネ由来ペルオキシダーゼ、過酸化水素前駆体、および、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる一種類以上の漂白活性化剤を含んでいることを特徴とする組成物。

〔１４〕 一種類以上の界面活性剤、もしくは、一種類以上の活性化剤を共に含んでいることを特徴とする〔１０〕から〔１３〕のいずれかに一項に記載の組

成物。

本発明により、洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の繊維染料の漂白を伴う繊維工業等での排水処理に関して、反応性と安定性に優れ、かつ、安価なペルオキシダーゼが提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、種々ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係についての比較結果を示す。図中、△：RHPはイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを、□：HRPは西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼを、◇：CCPはコルブリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼを、○：SBPは大豆由来ペルオキシダーゼをそれぞれ示す。

図2は、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジIIの退色反応における活性化剤（p-ヨードフェノール）の添加効果を示す。図中、RHPはイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを示す。×は活性化剤の添加を、△は活性化剤の無添加をそれぞれ表す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は、洗液中で布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合において、染色した布から他の布への繊維染料の移行を防止する方法であって、前記布を洗濯しおよび／またはすすぐ洗液に、イネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、または、過酸化水素前駆体、または、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤と過酸化水素前駆体との共存系、または、過酸化水素を発生しうる酵素系、を実質的に同時に存在させることを特徴とする方法に関するものである。

また、本発明は、溶液または分散液中の繊維染料を漂白する方法であって、



前記溶液または分散液に、イネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、または、過酸化水素前駆体、または、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤と過酸化水素前駆体との共存系、または、過酸化水素を発生しうる酵素系、を実質的に同時に存在させることを特徴とする方法に関するものである。

さらに、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼ、並びに、過酸化水素、または、過酸化水素前駆体、または、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤と過酸化水素前駆体との共存系、または、過酸化水素を発生しうる酵素系、を実質的に同時に含有している洗剤組成物もしくは漂白組成物の提供に関するものである。

本発明におけるイネ由来ペルオキシダーゼは、精製の程度により該酵素と共に含まれる不純物の量や質が異なってくるが、好ましくはそのRZ値が0.01以上、より好ましくは0.1以上、さらに好ましくは1.0以上のものを使用すればよい。尚、ここでいうRZ値とは、275nmと403nmに於ける吸光度の比である( $A_{275\text{nm}}/A_{403\text{nm}}$ )。この値は、ペルオキシダーゼ溶液中の蛋白質含量に対するヘム含量の比を表しており、ペルオキシダーゼの精製度の指標となる。

本発明における耐熱性のイネ由来ペルオキシダーゼとは、同酵素を含有しているイネモミガラから分離・精製・回収されるイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを代表例として挙げることができるが、耐熱性を有しているイネ由来ペルオキシダーゼであれば、その局在部等に関しては特に制限はない。たとえば、糠や茎葉部由来のイネ由来ペルオキシダーゼであっても、耐熱性を有していれば、本発明でいう耐熱性のイネ由来ペルオキシダーゼとする。尚、本発明においては、50℃以上で30分間の熱処理後においても、50%以上の活性が保持されていれば、耐熱性を有していると判定するが、後述の実施例のように、90℃にて30分間の熱処理後においても、90%以上の活性が保持されているような場合が最も好適な事例と言える。

本発明におけるイネ由来ペルオキシダーゼ、特にイネモミガラ由来ペルオキ

シダーゼは、特公平5-22510号公報記載の精製方法により、イネモミガラより容易に入手することができる。また、フナコシ株式会社より、試薬としても購入することができる。

さらに、近年のイネゲノム解析の成果等により、イネにおいても、複数のペルオキシダーゼ遺伝子の存在が報告されている（Chen ZHら；Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 2001;33(2):163-172）。すなわち、今日の遺伝子工学的な手法を利用すれば、これらのイネ由来のペルオキシダーゼをコードするDNA配列と、該ペルオキシダーゼをコードするDNA配列の発現を目的とする機能を有するDNA配列を結合させた組換えDNA分子を構築し、続いて該組換えDNA分子で宿主細胞や宿主植物体を形質転換して、イネ由来ペルオキシダーゼを効率良く生産させることも可能である。以上のような技術的な背景を踏まえた場合、形質転換された宿主細胞を培養し、もしくは、形質転換された宿主植物体を生育させて、得られた培養物、培養細胞、もしくは植物体からペルオキシダーゼを分離・精製・回収することにより得られるイネ由来ペルオキシダーゼも、本発明のイネ由来ペルオキシダーゼの範疇に含まれるものとする。

本発明におけるイネ由来ペルオキシダーゼの形態についての制限は特にないが、洗剤組成物や漂白剤組成物の成分として添加される場合を考慮すれば、無粉塵性顆粒や液体酵素製剤の形態であることが好ましい。尚、無粉塵性顆粒の場合は、米国特許第4,106,991号公報および第4,661,452号公報に記載のように作られ、そして場合により当該技術で公知の方法により被覆することができる。また、液体酵素製剤の場合は、確立された方法にしたがってポリオールたとえばプロピレングリコール、糖または糖アルコール、乳酸またはホウ酸等を加えることにより安定化させることができる。

本発明における洗液中で布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合、または、溶液または分散液中の繊維染料を漂白する場合においては、洗液や漂白液1リットル当たり0.001mgから1000mgのイネ由来ペルオキシダーゼを添加すればよい。さらに、その温度は、10℃から80℃の範囲、好ましくは

20℃から70℃の範囲、より好ましくは20℃から60℃の範囲で実施すればよい。さらに、洗液や漂白液のpHは、一般的pH、洗濯および／またはすすぐ場合の一般的なpH、すなわちpH6.5～10.5、好ましくは6.5～9.5、より好ましくは7.5～9.5で実施すればよい。

本発明における洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の繊維染料の漂白を行う場合においては、イネ由来ペルオキシダーゼと過酸化水素が実質的に同時に存在していることが必須である。この際、過酸化水素は洗濯および／またはすすぐプロセスの初め又は途中で、0.001～5mM、好ましくは0.01～1mMの量で存在させればよい。

過酸化水素の供給に際しては、過酸化水素自体が洗液、溶液または分散液に添加されてもよいし、現場において過酸化水素を発生する過酸化水素前駆体として供給されてもよい。

代表的な過酸化水素前駆体として、過ホウ酸塩、過炭酸塩、ペルオキシカルボン酸、またはその塩等が挙げられる。具体的には、過ホウ酸ナトリウムや過炭酸ナトリウムが挙げられる。

また、上述の過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤を過酸化水素前駆体と共存させてもよい。その様な漂白活性化剤としては、具体的には、ノナノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩、ドデカノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩、4-デカノイルオキシ安息香酸、テトラアセチルエチレンジアミン等が挙げられる。共存させるべき漂白活性化剤の量は、洗濯および／またはすすぐプロセスの初め又は途中で、約1μM～10mM、より好ましくは、約10μM～1mMの間が適当である。

さらに、過酸化水素供給源として、現場において過酸化水素を発生させる過酸化水素生成酵素系を選択してもよい。好ましい過酸化水素生成酵素系は、洗剤組成物へ都合良く含まれる安価で容易に入手可能な基質(過酸化水素前駆体)に作用するものである。このような基質(過酸化水素前駆体)の例としてはグルコースであり、これはグルコースオキシダーゼを用いることにより過酸化水素を供給することができる。他の適当なオキシダーゼは尿酸オキシダーゼ、ガ

ラクトースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アミノオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼである。

本発明における洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の繊維染料の漂白を行う場合においては、使用するイネ由来ペルオキシダーゼの染料移動阻止および漂白効果を強化するために、別の酸化性基質を共存させてもよい。これらの酸化性基質は、一般に活性化剤と称され、*p*-ヨードフェノール、*L*-アスコルビン酸、*p*-アミノフェノール、*p*-アミノ安息香酸基質などが具体例として挙げられるが、これらに限られたものではない。また、共存させるべき酸化性基質の量は、約  $1\ \mu\text{M}$ ~ $10\ \text{mM}$ 、より好ましくは、約  $10\ \mu\text{M}$ ~ $1\ \text{mM}$ の間が適当である。

本発明における洗濯またはすすぎ過程における染料移動阻止、並びに、溶液または分散液中の繊維染料の漂白を行う場合においては、陰イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤ならびにこれら界面活性剤の混合物が共存していてもよい。このような界面活性剤の例としては、アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS：陰イオン界面活性剤）、 $\alpha$ -オレフィンスルホン酸塩（AOS：陰イオン界面活性剤）、硫酸アルキルポリオキシエチレン塩（AES：陰イオン界面活性剤）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS：陰イオン界面活性剤）ラウリン酸ナトリウムのような長鎖脂肪酸塩（石鹸：陰イオン界面活性剤）、Brj 35（非イオン界面活性剤）、アルキルポリオキシエチレンエーテル（非イオン界面活性剤）、アルキルトリメチルアンモニウム塩（陽イオン界面活性剤）、ジアルキルジメチルアンモニウム塩（陽イオン界面活性剤）、ジメチルアルキルアミノオキシド（両性界面活性剤）などが挙げられるが、これらに限られたものではない。また、共存させるべき界面活性剤の量は、特に制限はないが、各界面活性剤の臨界ミセル濃度（CMC）以上が好ましい。

本発明においてイネ由来ペルオキシダーゼにより染料移動阻止および漂白の対象となる繊維染料については特に制限はなく、上述の活性化剤との共存下も含めて、通常使用される繊維染料に対して効果を発揮する。尚、ここでいう繊維染料とは、天然染料というまでもなく、合成的に作られるがただし構造およ

び特性は天然染料と同じである天然同一性染料、一般的なアゾ染料をはじめとして、アントラキノン染料などその他の合成染料を挙げることができる。さらに、繊維と共有結合により結合する反応性染料に対しても有効である。

最後に、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼ含んでいる組成物に関する。具体的には、洗剤組成物もしくは漂白剤組成物に関する。また、過酸化水素、または、その供給を目的とする成分との共存が必須であるが、そのために、過酸化水素前駆物質、漂白活性化剤や過酸化水素生成酵素系を成分の一つとして選択してもよい。すなわち、本発明は、イネ由来ペルオキシダーゼ、および、過酸化水素、過酸化水素の前駆体、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤と過酸化水素前駆体との共存系、および、過酸化水素を発生せしめることのできる酵素系のうちの少なくともどれか一つを含んでいることを特徴とする洗剤組成物もしくは漂白剤組成物に関する。

この組成物中のイネ由来ペルオキシダーゼ量については、特に制限はないが、好ましくは、洗液、溶液、もしくは分散液1リットル当たり0.001mgから1000mgのイネ由来ペルオキシダーゼを含有させればよい。

その形態についても、目的に都合の良いように紛体または液体いずれかの形態を選択すればよい。具体的には、上述のような無粉塵性顆粒や種々の安定剤により安定化された液体酵素製剤を選択することができる。特に、紛体の場合は、該組成物中の全成分を混合した造粒物からなる組成物、該組成物中の個別成分単独の造粒物や任意の複数成分の混合造粒物を混合させた組成物であってもよい。尚、ここでいう任意の複数成分の混合造粒物とは、一例を挙げれば、イネ由来ペルオキシダーゼと過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤を混合させた造粒物のことである。

この漂白剤組成物中のイネ由来ペルオキシダーゼ量については、洗剤組成物と同様に特に制限はない。また、その形態についても、同様である。

本発明における洗剤組成物中もしくは漂白剤組成物中には、過酸化水素自体は言うまでもなく、過酸化水素を効率よく発生させる目的で、過酸化水素前駆体、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤、および

過酸化水素を発生しうる酵素系のうちの少なくともどれか一つの成分が含まれていてもよい。また、本発明における洗剤組成物中もしくは漂白剤組成物中には、イネ由来ペルオキシダーゼによる漂白活性を増強するための活性化剤や、洗浄効果を増強するための界面活性剤を含んでもよい。

さらに、洗剤組成物を目的とする場合には、さらに当該技術での公知となっている他の洗剤成分、たとえば、ビルダー、抗腐蝕剤、金属イオン封鎖剤、抗一よごれ再付着剤、芳香剤、酵素安定剤等、他の洗剤酵素（たとえばプロテアーゼ、リパーゼまたはアミラーゼ）を含んでもよい。

本発明の洗剤組成物が添加された洗液もしくは漂白剤組成物が添加された漂白液のpHは、6.5～12であり、好ましくは、6.5～10.5である。

次に、本発明について、以下の実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に制限されるものではない。

#### [実施例1] イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と反応速度

オレンジ I I (C.I. Acid Orange 7: 関東化学より購入: 以下同じ) を基質とした退色反応により、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係について検討した。

日立製紫外可視分光光度計 U-2010 のセル内 (光路 1 cm) に、100  $\mu$ M オレンジ I I および 680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 9.0) 1 mL を加え、各温度で 10 分間ブレインキュベートした後、予め同じ温度にてブレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を 1 mL 注入して反応を開始し、オレンジ I I の最大吸収波長である 485 nm の経時的な吸光度の変化を測定した。

尚、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、フナコシ株式会社より販売されているイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ (商品番号 K0310100: 純度 RZ > 1.2) を使用した。また、同酵素のモル吸光係数は、西洋ワサビと同じく  $1.02 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$  (403 nm) とした。また、オレンジ I I は、和光純薬製の試薬を再結晶法で精製し、ロ紙分配クロマトグラムと

UV スペクトルで純度を確認して使用した。

このオレンジ I I の退色曲線から、反応速度式を解析した結果、退色反応はいずれの場合も擬一次反応で進行することが明らかとなった。そこで、以下の式 (1)

$$\text{式 (1): } \ln (C_0 / C_t) = k_t$$

(ここで、 $k_t$  ( $\text{min}^{-1}$ ) は擬一次速度定数、 $C_0$  はオレンジ I I の初濃度、 $C_t$  は反応時間  $t$  におけるオレンジ I I の濃度である。) に示す擬一次反応速度式からオレンジ I I の退色反応における温度と速度定数  $k_t$  の関係を求め、その結果を以下の表-1 に示した。

表-1

反応温度	$k_t$
20℃	1. 5 2
30℃	2. 2 8
40℃	3. 8 4
50℃	5. 8 1
60℃	7. 7 0
70℃	10. 1 0
80℃	11. 0 0

また、次の比較例 1 で示す西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌス シネレウス (*Corprinus cinerus*: 旧名 *Arthromyces ramosus*) 由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼに関する同様の結果 (表-2) の温度と速度定数  $k_t$  の関係と、本実施例におけるイネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と速度定数  $k_t$  の関係について、図-1 のように比較を行った。

その結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、他のペルオキシダーゼと比較した場合、高温での反応性並びに安定性に優れていることが判明した。

#### [比較例 1] 種々のペルオキシダーゼの温度と反応速度

オレンジ I I を基質とした退色反応により、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌス シネレウス (*Corprinus cinerus*: 旧名 *Arthromyces ramosus*)

由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係について検討した。

使用するペルオキシダーゼとして西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼを用いた以外は、実施例 1 と同一の方法と条件にて測定を行い、温度と速度定数  $k_t$  の関係を求め、その結果を以下の表 - 2 に示した。

尚、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼは和光純薬製の試薬 (R. Z. = 2. 6 5)、コルプリヌス・シネレウス由来ペルオキシダーゼは S i g m a 社製の試薬 (R. Z. = 2. 3 2)、および、大豆ペルオキシダーゼは S i g m a 社製の試薬 (R. Z. = 1. 1 1) を使用した。また、各酵素のモル吸光係数は、 $1. 0 2 \times 10^5 \text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$  (403 nm) とした。

また、本比較例並びに実施例 1 の結果について、図 - 1 のように比較を行った。

表 - 2

反応温度	西洋ワサビ	コルプリヌス シネレウス	大豆
20℃	1. 89	1. 42	0. 25
30℃	2. 40	2. 30	0. 40
40℃	3. 18	3. 58	0. 53
50℃	3. 78	3. 32	0. 88
60℃	4. 26	0. 34	1. 03
70℃	4. 40	—	1. 03

#### [実施例 2] 90℃における熱安定性の検討

オレンジ I I を基質とした退色反応において、90℃におけるイネモミガラ由来ペルオキシダーゼの熱安定性について検討した。

100  $\mu\text{M}$  オレンジ I I、および、680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む 0. 1 M T r i s - H C l 緩衝溶液 (pH 9. 0) を 90℃で 0 分間から 150 分間までブレインキュベートした。続いて、予め 80℃に保っておいた日立製紫外可視分光光度計 U - 2010 のセル内 (光路 1 cm) に



該プレインキュベート液 1 mL を加え、予め 80℃ にてプレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を 1 mL 注入して反応を開始し、実施例 1 と同様に、オレンジ I I の退色曲線から、プレインキュベート時間と速度定数  $k_t$  の関係を求め、その結果を以下の表-3 に示した。

すなわち、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼが 90℃ で高い耐熱性を示すことが判明した。

表-3

プレインキュベート時間	$k_t$
0 分間	11.0
10 分間	10.8
20 分間	10.8
30 分間	9.98
60 分間	9.87
90 分間	9.51
120 分間	9.51
150 分間	9.51

〔比較例 2〕 種々のペルオキシダーゼの 90℃ における熱安定性の検討

オレンジ I I を基質とした退色反応により、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼについて、90℃ における熱安定性について検討した。また、コルプリヌス シネレウス由来ペルオキシダーゼについては、90℃ では酵素が急速に失活してしまい、オレンジ I I の退色反応が進行しなかったため、50℃ における熱安定性について検討した。

使用するペルオキシダーゼとして、比較例 1 と同様にして西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ、コルプリヌス シネレウス由来ペルオキシダーゼ、大豆ペルオキシダーゼを用いた以外は、実施例 2 と同一の方法と条件（但し、コルプリヌス シネレウス由来ペルオキシダーゼの場合のみ、プレインキュベートおよび反応共に 50℃ にて実施）にて測定を行い、プレインキュベート時間と速度定数  $k_t$  の関係を求め、その結果を以下の表-4 に示した。

表-4

ブレインキュベート時間	西洋ワサビ	大豆	コルプリヌス シネレウス
0 分間	6. 0 8	1. 0 6	3. 3 2
5 分間	3. 0 0	—	1. 1 1
1 0 分間	0. 3 1 5	0. 8 5 5	—
2 0 分間	0. 2 9 3	—	0. 9 3 7
3 0 分間	0. 1 8 9	0. 8 7 4	—
6 0 分間	—	0. 8 2 8	—
1 5 0 分間	—	0. 7 4 3	0. 4 7 3

### 〔実施例 3〕 活性化剤（p-ヨードフェノール）の添加効果

オレンジ I I を基質とした退色反応において、活性化剤（p-ヨードフェノール）共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼの温度と反応速度の関係について検討した。

日立製紫外可視分光光度計 U-2010 のセル内（光路 1 cm）に、100  $\mu$ M オレンジ I I、100  $\mu$ M p-ヨードフェノール、および、680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液（pH 9.0）1 mL を加え、各温度で 10 分間ブレインキュベートした後、予め同じ温度にてブレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を 1 mL 注入して反応を開始し、実施例 1 と同様に、オレンジ I I の退色曲線から、温度と速度定数  $k_t$  の関係を求め、その結果を以下の表-5 に示した。また、本結果と実施例 1 の結果（表-1）より、p-ヨードフェノールの添加効果について比較した（図-2）。

すなわち、活性化剤（=P-ヨードフェノール）の添加により、各温度で反応速度が 1.3～1.5 倍増大することが判明した。

表－５

反応温度	$k_t$
20℃	2.42
30℃	2.64
40℃	5.32
50℃	8.23
60℃	10.50
70℃	15.10

#### [実施例４] 各種色素の退色速度定数の比較

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる各種色素の退色反応について、活性化剤（*p*-ヨードフェノール）の共存下・非共存下で検討した。

日立製紫外可視分光光度計U-2010のセル内（光路1cm）に、以下の表－４に示した各種色素100 $\mu$ M、および、680nmのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む0.1M Tris-HCl緩衝溶液（pH9.0）1mLを加え、20℃で10分間ブレインキュベートした後、予め同じ温度にてブレインキュベートしておいた1.5mM過酸化水素水を1mL注入して反応を開始し、実施例１と同様に、各種色素の退色曲線から、速度定数 $k_t$ の関係を求め、その結果を以下の表－６に示した。尚、*p*-ヨードフェノールを添加した場合は、100 $\mu$ Mとなるように0.1M Tris-HCl緩衝溶液（pH9.0）に添加した。

実験の結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの各種色素に対する退色効果が確認され、特に活性化剤の存在下で顕著であった。

表－６

反応温度	測定波長	<i>p</i> -ヨードフェノール	
		添加なし ( $k_t$ )	添加あり ( $k_t$ )
オレンジII	485.0nm	1.52	2.42
オレンジI	481.0nm	12.9	24.3
オレンジG	476.0nm	0.0603	0.574
トロペオリンO	427.8nm	0.0653	0.2
アリザリンイエローR	372.3nm	0.0434	—
アリザリンレッドS	516.0nm	0.395	70.6
カルコン	635.6nm	34.2	65.5

### 〔実施例 5〕 各種活性化剤の添加効果の比較

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I の退色反応について、各種活性化剤の添加効果について検討した。

日立製紫外可視分光光度計 U-2010 のセル内（光路 1 cm）に、オレンジ I I 100  $\mu$ M、以下の表-5 に示した各種活性化剤 100  $\mu$ M、および、680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ、を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液（pH 9.0）1 mL を加え、20℃ で 10 分間ブレインキュベートした後、予め同じ温度にてブレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を 1 mL 注入して反応を開始し、実施例 1 と同様に、オレンジ I I の退色曲線から、速度定数  $k_t$  の関係を求め、その結果を以下の表-7 に示した。

実験の結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I の退色反応における各種活性化剤の添加効果が確認された。

表-7

活性化剤	$k_t$
無添加	1.52
p-ヨードフェノール	2.42
L-アスコルビン酸	1.90
p-アミノフェノール	1.67
p-アミノ安息香酸	1.65
グルタチオン（還元型）	1.27
D-グルコース	1.57

### 〔実施例 6〕 活性化剤（=p-ヨードフェノール）濃度の検討

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I およびオレンジ G を基質とした退色反応において、活性化剤（p-ヨードフェノール）濃度の影響について検討した。

日立製紫外可視分光光度計 U-2010 のセル内（光路 1 cm）に、100

$\mu\text{M}$ オレンジ I I（またはオレンジ G）、以下の表－8 に示す濃度の p－ヨードフェノール、および、680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液（pH 9.0）1 mL を加え、20℃ で 10 分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を 1 mL 注入して反応を開始し、実施例 1 と同様に、オレンジ I I の退色曲線から、p－ヨードフェノール濃度と速度定数  $k_t$  の関係を求め、その結果を以下の表－8 に示した。尚、オレンジ I I は、485 nm の吸光度変化を、オレンジ G は、476 nm の吸光度変化をそれぞれ測定した。

その結果、種々の p－ヨードフェノール濃度下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I 及びオレンジ G の退色効果が確認された。

表－8

p－ヨードフェノール濃度	$k_t$	
	オレンジ I I	オレンジ G
1000 $\mu\text{M}$	3.89	2.42
200 $\mu\text{M}$	3.71	2.21
100 $\mu\text{M}$	2.42	0.56

#### 〔実施例 7〕 界面活性剤添加の影響

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I を基質とした退色反応において、界面活性剤を添加した場合の影響について検討した。

日立製紫外可視分光光度計 U－2010 のセル内（光路 1 cm）に、100  $\mu\text{M}$  オレンジ I I、以下の表－9 に示す界面活性剤、および、680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液（pH 9.0）1 mL を加え、20℃ または 60℃ で 10 分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を 1 mL 注入して反応を開始し、実施例 1 と同様に、オレンジ I I の退色曲線から速度定数  $k_t$  を求め、その結果を以下の表－9 に示した。尚、各界面活性剤の添加量は、反応時の濃度が臨界ミセル濃度（CMC）の 1.5 倍

濃度となるように調製した。

その結果、各種界面活性剤の存在下においても、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I の退色効果が確認された。

表－9

界面活性剤（種別）	濃度（終濃度）	$k_t$	
		20℃	60℃
無添加区	—	1.52	7.70
ドデシル硫酸ナトリウム （SDS：陰イオン界面活性剤）	8.55 mM	1.20	6.72
アルキルベンゼンスルホネート （LAS：陰イオン界面活性剤）	7.35 mM	1.26	8.38
Brij 35 （非イオン界面活性剤）	90 $\mu$ M	1.29	7.46
ラウリン酸ナトリウム （石けん）	10.1 mM	1.43	5.73

#### 〔実施例 8〕 モデル洗剤系での効果

モデル洗剤系でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I を基質とした退色効果について検討した。

日立製紫外可視分光光度計 U-2010 のセル内（光路 1 cm）に、100  $\mu$ M オレンジ I I、以下に示す組成のモデル洗剤成分、および、680 nM のイネモミガラ由来ペルオキシダーゼを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液（pH 9.0）1 mL を加え、20℃、40℃、または 60℃ で 10 分間プレインキュベートした後、予め同じ温度にてプレインキュベートしておいた 1.5 mM 過酸化水素水を 1 mL 注入して反応を開始し、実施例 1 と同様に、オレンジ I I の退色曲線から速度定数  $k_t$  を求め、その結果を以下の表－10 に示した。

尚、モデル洗剤における各成分（終濃度）は以下のとおりである。

- ・ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）；8.6 mM
- ・炭酸ナトリウム；2.8  $\mu$ M
- ・亜硫酸ナトリウム；1.8 mM

- ・メタケイ酸ナトリウム；4. 1  $\mu$ M
- ・EDTA；59  $\mu$ M
- ・カルボキシメチルセルロース；0. 0001%

すなわち、モデル洗剤系での、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによるオレンジ I I の退色効果が、各温度で確認された。

表－10

洗浄温度	$k_t$
20℃	1. 43
40℃	3. 77
60℃	4. 16

#### 〔実施例9〕 試験布への移染防止効果（1）

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジ I I をモデル繊維染料とした系にて検討した。

衣生活研究会の実験用ナイロン白生地を容量比1：1のメタノール－水混合溶液中で水溶性成分を除去した後、風乾し、ついでベンゼンで油性成分を除去し、風乾した。以後、これを試験布（白布、以下同じ）として使用した。

試験布0. 2gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1：50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ（360 nM）と過酸化水素（790  $\mu$ M）を含む50 mM Tris－HCl 緩衝溶液（pH 9. 0）9. 5 mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1 mM オレンジ I I 水溶液を0. 5 mL 加え、20℃で30分間反応を行った。反応後、取り出した試験布を風乾した。続いて、移染防止実験を行った後のオレンジ I I の試験布への着色の度合いを表すために、ミノルタ製色彩色差計CR－300を用いて色差（ $\Delta E$ ）を測定した。

尚、ここでいう色差（ $\Delta E$ ）とは、国際照明委員会（CIE）による感覚的表色法の色相、明度、彩度の3属性ではなく色の感覚を定量的に表示するために定義している数値を示す。すなわち、色差（ $\Delta E$ ）のパラメータであるL、

a、bを色差計を用いて測定し、以下に示すHunterの色差式（数2）により $\Delta E$ を算出することができる。

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

$$\Delta L = L_0 - L_w, \Delta a = a_0 - a_w, \Delta b = b_0 - b_w$$

（式中、 $L_0$ 、 $a_0$ 、 $b_0$ は処理前の試験布のL、a、b値を示し、 $L_w$ 、 $a_w$ 、 $b_w$ は処理後の試験布のL、a、b値を示す。）

また、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。さらに、上記の系に界面活性剤として、アルキルベンゼンスルホネート（LAS：陰イオン界面活性剤）、または、ラウリン酸ナトリウム（石けん）を終濃度がそれぞれ7.35 mMまたは10.1 mMとなるように添加した場合についても検討を行った。以下の表-11にそれぞれの試験区の結果をまとめた。

下記に示すとおり、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの添加により試験布へのオレンジIIの移染が防止された。また、LAS、または、ラウリン酸ナトリウムの存在下でも移染防止効果が確認された。

表-11

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	界面活性剤	色差 ( $\Delta E$ )
添加	無添加	1.19 ± 0.38
無添加	無添加	10.60 ± 0.58
添加	LAS	0.65 ± 0.08
添加	ラウリン酸ナトリウム	0.61 ± 0.03

#### [実施例10] 試験布への移染防止効果（2）

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果に及ぼすpHの影響について、オレンジIIをモデル繊維染料とした系にて検討した。

関西衣生活研究会のナイロン布（6ナイロン）を容量比1：1のメタノール-水混合溶液中で水溶性成分を除去した後、風乾した。ついでベンゼンで油性成分を除去し、風乾した後に、試験布（白布、以下同じ）とした。



試験布 0.2 g をバイアル瓶に入れ、最終の浴比が 1 : 50 となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ (360 nM)、過酸化水素 (790  $\mu$ M) 水溶液 9.5 mL、または、過酸化水素 (790  $\mu$ M) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 9.0) 9.5 mL、または、過酸化水素 (790  $\mu$ M) を含む Carmody 緩衝溶液 (pH 10.0) 9.5 mL、を加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に 1 mM オレンジ II 水溶液を 0.5 mL 加え、20℃にて 30 分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例 9 と同様に色差 ( $\Delta E$ ) を測定した結果、以下の表-12 のようになった。尚、比較例として、SDS、または、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。

その結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの添加により試験布へのオレンジ II の移染が防止された。また、pH の影響は見出されなかった。

表-12

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	緩衝液	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	なし	30.10
無添加	50 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 9.0)	21.52
添加	同上	4.47
無添加	Carmody 緩衝溶液 (pH 10.0)	21.01
添加	同上	2.47

### [実施例 11] 試験布への移染防止効果 (3)

SDS 共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジ II をモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例 9 で調製した試験布 0.2 g をバイアル瓶に入れ、最終の浴比が 1 : 50 となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ (360 nM)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS : 9.0 mM)、過酸化水素 (790  $\mu$ M) を含む 50

mMTri s-HCl 緩衝溶液 (pH 9.0) 9.5 mL を加え、20℃、または、60℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1 mM オレンジ II 水溶液を0.5 mL 加え、20℃、または、60℃にて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例9と同様に色差 ( $\Delta E$ ) を測定した結果、以下の表-13のようになった。尚、比較例として、SDS、または、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。

その結果、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼの添加により試験布へのオレンジ II の移染が防止された。また、SDS の共存下では、移染防止の相乗効果が確認された。

表-13

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	SDS	色差 ( $\Delta E$ ): 20℃	色差 ( $\Delta E$ ): 60℃
添加	添加	0.35 ± 0.02	0.91 ± 0.45
添加	無添加	1.19 ± 0.38	2.43 ± 0.15
無添加	添加	2.30 ± 0.33	4.92 ± 0.32
無添加	無添加	10.60 ± 0.58	(データなし)

#### [実施例12] 試験布への移染防止効果 (4)

Brij 35 の共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジ II をモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例9で調製した試験布0.2 g をバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ (360 nM)、Brij 35 (95  $\mu$ M)、過酸化水素 (790  $\mu$ M) を含む50 mM Tri s-HCl 緩衝溶液 (pH 9.0) 9.5 mL を加え、20℃、または、60℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1 mM オレンジ II 水溶液を0.5 mL 加え、20℃、または、60℃にて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例9と同様に色差 ( $\Delta E$ ) を測定

した結果、以下の表－１４のようになった。尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。

すなわち、B r i j 3 5の共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布へのオレンジ I I の移染防止効果が確認された。

表－１４

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	色差 ( $\Delta E$ ): 20℃	色差 ( $\Delta E$ ): 60℃
添加	0.96 ± 0.09	3.71 ± 0.42
無添加	7.18 ± 0.61	19.10 ± 0.67

〔実施例 13〕 試験布への移染防止効果（５）

過炭酸ナトリウムの共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジ I I をモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例 10 で調製した試験布 0.2 g をバイアル瓶に入れ、最終の浴比が 1 : 50 となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ (360 nM)、過炭酸ナトリウム (105 mM) または過酸化水素 (790  $\mu$ M) を含む 50 mM T r i s - H C l 緩衝溶液 (pH 9.0) 9.5 mL を加え、20℃、または、40℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に 1 mM オレンジ I I 水溶液を 0.5 mL 加え、20℃、または、40℃にて 30 分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例 9 と同様に色差 ( $\Delta E$ ) を測定した結果、以下の表－１５のようになった。尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。

すなわち、過炭酸ナトリウムの共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布へのオレンジ I I の移染防止効果が確認された。

表-15

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過炭酸 ナトリウム	過酸化 水素	温度	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	無添加	20℃	21.52
無添加	添加	無添加	同上	9.23
添加	無添加	添加	同上	4.47
添加	添加	無添加	同上	1.55
無添加	無添加	無添加	40℃	23.76
無添加	添加	無添加	同上	2.12
添加	無添加	添加	同上	6.33
添加	添加	無添加	同上	1.20

#### [実施例14] モデル洗剤系での移染防止効果 (1)

モデル洗剤成分共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジ I I をモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例9で調製した試験布0.2gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ(360nM)、過酸化水素(790 $\mu$ M)とモデル洗剤成分(組成と終濃度は実施例8と同じ)を混合した水9.5mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1mMオレンジ I I 水溶液を0.5mL加え、20℃にて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例9と同様に色差( $\Delta E$ )を測定した結果、以下の表-16ようになった。尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼおよびモデル洗剤成分を添加しない系(単純な水系)でも同様の検討を行った。

すなわち、モデル洗剤成分共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布へのオレンジ I I の移染防止効果が確認された。

表-16

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	モデル洗剤成分	色差 ( $\Delta E$ )
添加	添加	0.27 $\pm$ 0.04
無添加	無添加	13.70 $\pm$ 0.61

## [実施例15] モデル洗剤系での移染防止効果(2)

漂白活性化剤を含有するモデル洗剤成分共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、オレンジIIをモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例10で調製した試験布0.2gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ(360nM)、過炭酸ナトリウム(105mM)、モデル洗剤成分(組成と終濃度は実施例8と同じ)、および、漂白活性化剤(ノナノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩、または、ドデカノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩、または、4-デカノイルオキシ安息香酸;濃度は各52mM)を混合した水9.5mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1mMオレンジII水溶液を0.5mL加え、20℃にて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例9と同様に色差( $\Delta E$ )を測定した結果、以下の表-17ようになった。すなわち、漂白活性化剤共存下でのイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布へのオレンジIIの移染防止効果が確認された。

表-17

漂白活性化剤	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	1.67
ノナノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩	0.43
ドデカノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩	0.51
4-デカノイルオキシ安息香酸	0.58

## [実施例16] 試験布への移染防止効果(6)

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果について、反応性染料シバクロンブルー F 3 G - A (C. I. Reactive Blue 2:Fluka Bioceika 社より購入) をモデル繊維染料とした系にて検討した。

(社) 日本油化学会指定の洗浄試験用綿布 (晒金巾 2 0 2 3) を容量比 1 : 1 のメタノール-水混合溶液中で水溶性成分を除去した後、風乾し、ついでベンゼンで油性成分を除去し、風乾した。以後、これを試験布として使用した。

実施例 1 0 で調製したナイロン試験布 0. 2 g、または、上記の綿試験布 0. 2 g をバイアル瓶に入れ、最終の浴比が 1 : 5 0 となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ (3 6 0 nM)、p - ヨードフェノール (5 2  $\mu$ M)、過炭酸ナトリウム (1 0 5 mM) または過酸化水素 (7 9 0  $\mu$ M) を含む 5 0 mM Tris - HCl 緩衝溶液 (pH 9. 0) 9. 5 mL を加え、2 0  $^{\circ}$ C、または、4 0  $^{\circ}$ C にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に 1 mM シバクロンブルー F 3 G - A 水溶液を 0. 5 mL 加え、2 0  $^{\circ}$ C、または、4 0  $^{\circ}$ C にて 3 0 分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例 9 と同様に色差 ( $\Delta E$ ) を測定した結果、以下の表 - 1 8 および表 - 1 9 のようになった。

尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系、過炭酸ナトリウムを添加しない系、5 0 mM Tris - HCl 緩衝溶液の代わりに水を用いた系でも同様の検討を行った。

表 - 1 8 ナイロン試験布での結果

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過酸化水素源	Tris 緩衝液	温度	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	不使用 (水)	2 0 $^{\circ}$ C	1 0. 3 1
無添加	無添加	使用	同上	1 0. 4 1
無添加	過炭酸 ナトリウム	使用	同上	2. 8 4
添加	過酸化水素	使用	同上	1. 1 0
添加	過炭酸 ナトリウム	使用	同上	1. 3 8
無添加	無添加	不使用 (水)	4 0 $^{\circ}$ C	1 7. 3 8
無添加	無添加	使用	同上	1 3. 7 9
添加	過酸化水素	使用	同上	4. 0 1

表-19 綿試験布での結果

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過酸化水素源	Tris 緩衝液	温度	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	不使用(水)	20℃	1.39
無添加	無添加	使用	同上	7.86
無添加	過炭酸 ナトリウム	使用	同上	18.82
添加	過酸化水素	使用	同上	1.51
添加	過炭酸 ナトリウム	使用	同上	5.54
無添加	無添加	不使用(水)	40℃	1.38
無添加	無添加	使用	同上	9.07
添加	過酸化水素	使用	同上	2.86

## [実施例17] 試験布への移染防止効果(7)

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる試験布への移染防止効果に及ぼすpHの影響について、反応性染料シバクロンブルーF3G-Aをモデル繊維染料とした系にて検討した。

実施例10で調製したナイロン試験布0.2g、または、実施例16で調製した綿試験布0.2gをバイアル瓶に入れ、最終の浴比が1:50となるようにイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ(360nM)、p-ヨードフェノール(50 $\mu$ M)、過酸化水素(790 $\mu$ M)を含むCarmody緩衝液(pH10.0)9.5mLを加え、20℃、または、40℃にて攪拌を開始した。つぎに、バイアル瓶に1mMシバクロンブルーF3G-A水溶液を0.5mL加え、20℃または、40℃にて30分間反応を行った。

反応後、取り出した試験布を風乾し、実施例9と同様に色差( $\Delta E$ )を測定した結果、以下の表-20のようになった。

尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系でも同様の検討を行った。

表-20

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	試験布	温度	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	ナイロン	20℃	4.33
無添加	同上	同上	2.63
無添加	同上	40℃	8.92
添加	同上	同上	2.15
添加	綿	20℃	17.16
無添加	同上	同上	5.48
無添加	同上	40℃	15.41
添加	同上	同上	4.01

## [実施例18] 染色布の色落作用(1)

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布の色落作用について、オレンジIIをモデル繊維染料とし、洗浄温度を20℃とした場合について、検討した。

衣生活研究会の実験用ナイロン布をオレンジII 2% (対繊維重量)、酢酸10% (対繊維重量)、無水硫酸ナトリウム10% (対繊維重量) を含み、かつ、浴比が1:50の水溶液中に入れ、該水溶液を室温から15分間で90℃に昇温した。その後15分間染色処理し、水洗後風乾し、染色布(原布)とした。

バイアル瓶に過酸化水素(終濃度で750  $\mu$ M)、および、以下の表-21に示す成分を含む水溶液10.0mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、染色布0.2g(最終の浴比が1:50)を入れ、20℃で攪拌を続けた。30分後、染色布を取り出し、原布に対する色差( $\Delta E$ )を実施例9と同様に測定した。その結果を以下の表-21にまとめた。

すなわち、20℃において、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼは、染色布に対する色落ち作用を示さなかった。



表-21

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ (終濃度)	界面活性剤 (終濃度)	緩衝成分 (終濃度)	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	無添加 [水のみ]	0.615
無添加	無添加	T r i s-HC l (50 mM)	0.583
添加 (340 nM)	無添加	T r i s-HC l (50 mM)	0.710
添加 (340 nM)	S D S (8.55 mM)	T r i s-HC l (50 mM)	0.601
添加 (340 nM)	B r i j 35 (90 $\mu$ M)	T r i s-HC l (50 mM)	0.767
添加 (340 nM)	モデル洗剤成分 (実施例7参照)	無添加 [水のみ]	0.275

## [実施例19] 染色布の色落ち作用 (2)

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布の色落作用について、オレンジIIをモデル繊維染料とし、洗浄温度を60℃とした場合について、検討した。

バイアル瓶に過酸化水素 (終濃度で750  $\mu$ M)、および、以下の表-22に示す成分を含む水溶液10.0 mLを加え、60℃にて攪拌を開始した。つぎに、実施例18で調製した染色布0.2 g (最終の浴比が1:50)を入れ、60℃で攪拌を続けた。30分後、染色布を取り出し、原布に対する色差 ( $\Delta E$ ) を実施例9と同様に測定した。その結果を以下の表-22にまとめた。

実験の結果、60℃では、S D S及びT r i s-HC l緩衝剤による染色布に対する色落ち作用が示されたが、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しても、染色布に対する色落ち作用は増幅されなかった。

表-22

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ (終濃度)	界面活性剤 (終濃度)	緩衝成分 (終濃度)	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	無添加 [水のみ]	1.23
無添加	無添加	Tris-HCl (50mM)	14.43
添加 (340nM)	無添加	Tris-HCl (50mM)	14.51
無添加	SDS (8.55mM)	Tris-HCl (50mM)	18.00
添加 (340nM)	SDS (8.55mM)	Tris-HCl (50mM)	17.88

### 【実施例20】 染色布から白色布への移染防止作用(1)

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布から白色布への移染防止作用について、オレンジIIをモデル繊維染料とし、洗浄温度を20℃とした場合について検討した。

バイアル瓶にイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ(360nM)、過炭酸ナトリウム(105mM)または過酸化水素(790 $\mu$ M)を含む50mM Tris-HCl緩衝溶液(pH9.0)20.0mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、実施例18で調製した染色布0.2g(最終の浴比が1:50)、並びに、実施例10で調製した試験布(白布)0.2gを入れ、20℃で攪拌を続けた。30分後、染色布および試験布を取り出し、それぞれの原布に対する色差( $\Delta E$ )を実施例9と同様に測定した。尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系、過炭酸ナトリウムを添加しない系、50mM Tris-HCl緩衝溶液の代わりに水を用いた系でも同様の検討を行った。

その結果を以下の表-23、および、表-24にまとめた。すなわち、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布から白色布への移染防止作用が確認された。

表-23 染色布の変退色（退色した色差）

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過炭酸水素源	Tris 緩衝液	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	不使用（水）	0.90
無添加	無添加	使用	2.39
添加	過酸化水素	使用	3.39
無添加	過炭酸 ナトリウム	使用	2.09
添加	過炭酸 ナトリウム	使用	2.31

表-24 白布の変色（着色した色差）

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過炭酸水素源	Tris 緩衝液	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	不使用（水）	34.63
無添加	無添加	使用	37.20
添加	過炭酸水素	使用	23.06
無添加	過炭酸 ナトリウム	使用	30.59
添加	過炭酸 ナトリウム	使用	21.85

## 〔実施例21〕 染色布から白色布への移染防止作用（2）

漂白活性化剤の共存下において、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布から白色布への移染防止作用について、オレンジⅠⅠをモデル繊維染料とし、洗浄温度を20℃とした場合について検討した。

バイアル瓶にイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ（360 nM）、過炭酸ナトリウム（105 mM）、漂白活性化剤（ノナノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩、または、ドデカノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩、または、4-デカノイルオキシ安息香酸；濃度は各52 mM）を含む50 mM Tris-HCl 緩衝溶液（pH 9.0）20.0 mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、実施例18で調製した染色布0.2 g（最終の浴比が1：50）、並びに、実施例10で調製した試験布（白布）0.2 gを入れ、20℃

で攪拌を続けた。30分後、染色布および試験布を取り出し、それぞれの原布に対する色差 ( $\Delta E$ ) を実施例9と同様に測定した。

その結果を以下の表-25、および、表-26にまとめた。すなわち、漂白活性化剤の共存下におけるイネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布から白色布への移染防止作用が確認された。

表-25 染色布の変退色 (退色した色差)

漂白活性化剤	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	2.53
ノナノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩	2.46
ドデカノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩	2.35
4-デカノイルオキシ安息香酸	2.62

表-26 白布の変色 (着色した色差)

漂白活性化剤	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	22.53
ノナノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩	8.56
ドデカノイルオキシベンゼンスルホナート・ナトリウム塩	9.43
4-デカノイルオキシ安息香酸	10.35

#### [実施例22] 染色布から白色布への移染防止作用 (3)

イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布から白色布への移染防止作用について、反応性染料シバクロンブルーF3G-Aをモデル繊維染料とし、洗浄温度を20℃とした場合について検討した。

シバクロンブルーF3G-A (対繊維重量の2%)、無水硫酸ナトリウム (60g/L) を含む水溶液中に、(社)日本油化学会指定の洗浄試験用綿布 (晒金巾2023) を浴比が1:30となるように入れ、該水溶液を室温から5分間で40℃に昇温した。25分間染色処理した後、綿布を取り出し、軽く脱液した。残った染色水溶液中に炭酸ナトリウムを60g/Lの濃度になるように加え、再度綿布を入れて、20分で75℃から80℃に昇温後、30分間染色

した。綿布を再び取り出し、水洗後風乾し、染色布（原布）とした。

バイアル瓶にイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ（360 nM）、p-ヨードフェノール（52  $\mu$ M）、過炭酸ナトリウム（105 mM）または過酸化水素（790  $\mu$ M）を含む50 mM Tris-HCl 緩衝溶液（pH 9.0）30.0 mLを加え、20℃にて攪拌を開始した。つぎに、調製した染色布0.2 g（最終の浴比が1：50）、および、実施例10で調製したナイロン試験布（白布）0.2 g、および、実施例16で調製した綿試験布（白布）0.2 gを入れ、20℃で攪拌を続けた。30分後、染色布および試験布を取り出し、それぞれの原布に対する色差（ $\Delta E$ ）を実施例9と同様に測定した。尚、比較例として、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼを添加しない系、過炭酸ナトリウムを添加しない系、50 mM Tris-HCl 緩衝溶液の代わりに水またはCarmody 緩衝液（pH 10.0）を用いた系でも同様の検討を行った。

その結果を以下の表-27、表-28、および、表-29にまとめた。すなわち、反応性染料においても、イネモミガラ由来ペルオキシダーゼによる染色布から白色布への移染防止作用が確認された。

表-27 染色布の変退色（退色した色差）

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過炭酸水素源	緩衝液の種類	色差（ $\Delta E$ ）
無添加	無添加	不使用（水）	2.91
無添加	無添加	Carmody 緩衝液	2.95
添加	過酸化水素	Carmody 緩衝液	2.78
無添加	無添加	Tris 緩衝液	3.36
添加	過酸化水素	Tris 緩衝液	3.67
無添加	過炭酸 ナトリウム	Tris 緩衝液	2.91
添加	過炭酸 ナトリウム	Tris 緩衝液	2.93

表-28 ナイロン白布の変色（着色した色差）

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過炭酸水素源	緩衝液の種類	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	不使用（水）	16.19
無添加	無添加	Carmody 緩衝液	3.66
添加	過酸化水素	Carmody 緩衝液	1.73
無添加	無添加	Tris 緩衝液	7.04
添加	過酸化水素	Tris 緩衝液	3.19
無添加	過炭酸 ナトリウム	Tris 緩衝液	4.22
添加	過炭酸 ナトリウム	Tris 緩衝液	3.18

表-29 綿白布の変色（着色した色差）

イネモミガラ由来 ペルオキシダーゼ	過炭酸水素源	緩衝液の種類	色差 ( $\Delta E$ )
無添加	無添加	不使用（水）	1.47
無添加	無添加	Carmody 緩衝液	7.08
添加	過酸化水素	Carmody 緩衝液	1.75
無添加	無添加	Tris 緩衝液	3.22
添加	過酸化水素	Tris 緩衝液	1.49
無添加	過炭酸 ナトリウム	Tris 緩衝液	9.92
添加	過炭酸 ナトリウム	Tris 緩衝液	5.50

## 産業上の利用可能性

本発明に係るイネ由来ペルオキシダーゼ（より具体的にはイネモミガラ由来ペルオキシダーゼ）は高温での反応性並びに安定性に優れている。よって、本発明によりイネ由来ペルオキシダーゼを用いることにより、洗液中で染色された布を含む複数の布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合において、染色された一方の布から他の布への繊維染料の移行を防止する方法（染料移動阻止方法）が提供される。

また、本発明によりイネ由来ペルオキシダーゼを用いて溶液または分散液中の繊維染料を漂白する方法が提供される。

更に本発明によりイネ由来ペルオキシダーゼを用いた溶液中の着色物質（染料など）の分解（脱色・漂白）用組成物が提供される。

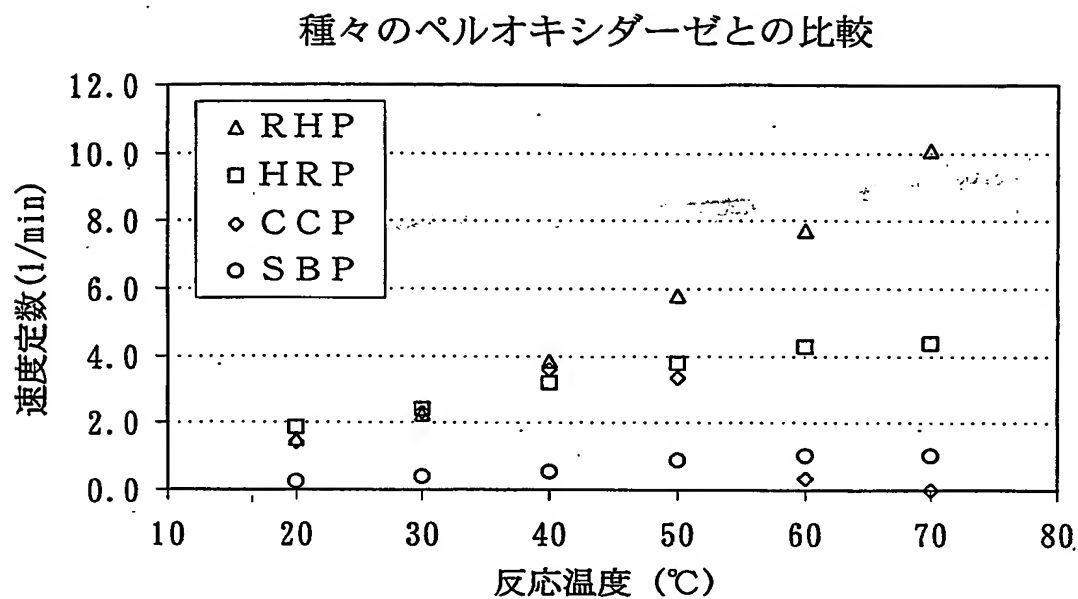
## 請求の範囲

1. 洗液中で染色された布を含む複数の布と一緒に洗濯および／またはすすぐ場合において、染色された一方の布から他の布への繊維染料の移行を防止する方法であって、該洗液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。
2. 溶液または分散液中の繊維染料を漂白する方法であって、前記溶液または分散液に過酸化水素の存在下でイネ由来ペルオキシダーゼを作用させることを特徴とする方法。
3. イネ由来ペルオキシダーゼが、耐熱性のイネ由来ペルオキシダーゼであることを特徴とする請求の範囲第1項または第2項のいずれか1項に記載の方法。
4. イネ由来ペルオキシダーゼが、イネモミガラ由来のペルオキシダーゼであることを特徴とする請求の範囲第1項から第3項のいずれか1項に記載の方法。
5. 過酸化水素が、過酸化水素前駆体、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる漂白活性化剤と過酸化水素前駆体との共存系、および過酸化水素を発生しうる酵素系のうちの少なくともどれか一つの手段により供給されることを特徴とする請求の範囲第1項から第4項のいずれか1項に記載の方法。
6. 過酸化水素前駆体が過ホウ酸塩または過炭酸塩である請求の範囲第5項に記載の方法。
7. 活性化剤の存在下において実施することを特徴とする請求の範囲第1項から第6項のいずれか1項に記載の方法。
8. 界面活性剤の存在下において実施することを特徴とする請求の範囲第1項から第7項のいずれか1項に記載の方法。
9. 繊維染料が合成染料、天然染料又は天然同一性染料、反応性染料である請求の範囲第1項から第8項のいずれか1項に記載の方法。

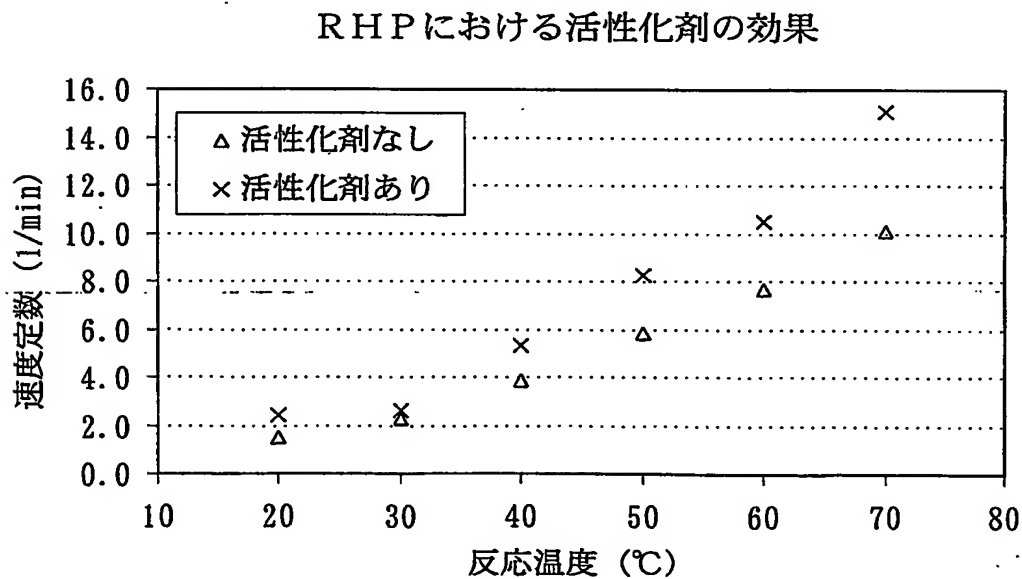


- 1 0. イネ由来ペルオキシダーゼを含んでいる組成物。
- 1 1. 洗剤組成物もしくは漂白剤組成物であることを特徴とする請求の範囲第 1 0 項に記載の組成物。
- 1 2. 過酸化水素、一種類以上の過酸化水素前駆体、および、過酸化水素を発生せしめることのできる一種類以上の酵素系のうちの少なくともどれか一つを含んでいることを特徴とする請求の範囲第 1 0 または第 1 1 項のいずれか一項に記載の組成物。
- 1 3. イネ由来ペルオキシダーゼ、過酸化水素前駆体、および、過酸化水素前駆体に作用し過酸化水素を発生しうる一種類以上の漂白活性化剤を含んでいることを特徴とする組成物。
- 1 4. 一種類以上の界面活性剤、もしくは、一種類以上の活性化剤を共に含んでいることを特徴とする請求の範囲第 1 0 項から第 1 3 項のいずれかに一項に記載の組成物。

第 1 図



第 2 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/12143

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C11D3/386, 3/395, C12N9/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C11D1/00-19/00, C12N9/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 7-91169 B2 (ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.), 04 October, 1995 (04.10.95), Claim 1; page 2, right column, line 49 to page 3, left column, line 10; examples 1 to 8 (a reference cited in the specification of the present application) (Family: none)	10 1-9, 11-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ -See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
26 December, 2003 (26.12.03)

Date of mailing of the international search report  
27 January, 2004 (27.01.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12143

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2801398 B2 (NOVO-NORDISK A/S), 10 July, 1998 (10.07.98), Claim 1; page 4, left column, lines 13 to 34; examples 1, 3, 9, 11 to 12 (a reference cited in the specification of the present application) & EP 495836 A1 & US 5273896 A1 & US 5605832 A1 & US 5648262 A1 & US 5700770 A1 & US 5712153 A1 & US 5855621 A1 & CN 1051600 A1 & BR 9007739 A1 & FI 9201315 A	1-14
Y	JP 10-500728 A (NOVO-NORDISK A/S), 20 January, 1998 (20.01.98), Abstract; Claims 1, 6, 9; page 7, lines 1 to 9 & WO 95/33039 A1 & EP 763094 A1 & CN 1149314 A1 & BR 9507773 A & FI 9604763 A	1-14
Y	JP 10-501274 A (PROCTER AND GAMBLE CO.), 03 February, 1998 (03.02.98), Abstract; Claim 1; page 5, 16th line from the bottom to 14th line from the bottom & WO 95/33040 A1 & US 5451337 A1 & EP 763093 A1 & CN 1154139 A1 & BR 9507808 A	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/12143

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 14 resides exclusively in "rice-origin peroxidase".

However, rice-origin peroxidase is disclosed in a document "JP 7-91169 B" and a composition (plant growth promoter) containing rice-origin peroxidase is also described therein.

Namely, the rice-origin peroxidase which is the common matter as described above falls within the category of prior art and, therefore, cannot be considered as "a special technical feature" in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2. It is therefore obvious that claims 1 to 14 do not comply with the requirement of unity of invention. (Continued to extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12143

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

The inventions according to claim 1 and parts of claims 3 to 9 relate to the prevention of fiber dye migration with the use of the rice-origin peroxidase. The inventions according to claim 2 and parts of claims 3 to 9 relate to the bleaching of a fiber dye with the use of the rice-origin peroxidase. The inventions according to claims 10 to 14 relate to compositions containing the rice-origin peroxidase which are not restricted in use to the prevention of fiber dye migration or bleaching thereof.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C11D3/386, 3/395, C12N9/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C11D1/00-19/00, C12N9/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 7-91169 B2 (ASAHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.), 1995.10.04, 請求項1, 第2頁右欄49行-第3頁左欄第10行, 実施例1-8, (本願明細書中で引用), (ファミリーなし)	10 1-9, 11-14
Y	JP 2801398 B2 (NOVO-NORDISK A/S), 1998.07.10, 請求項1, 第4頁左欄第13-34行, 例1, 3, 9, 11-12, (本願明細書中で引用), & EP 495836 A1 & US 5273896 A1 & US 5605832 A1 & US 5648262 A1 & US 5700770 A1 & US 5712153 A1 & US 5855621 A1 & CN 1051600 A1 & BR 9007739 A1 & FI 9201315 A	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.12.03

国際調査報告の発送日

27.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

井上 典之



4V

9360

電話番号 03-3581-1101 内線 3402

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 10-500728 A (NOVO-NORDISK A/S), 1998. 01. 20, 要約, 請求項1, 6, 9, 第7頁第1-9行, & WO 95/33039 A1 & EP 763094 A1 & CN 1149314 A1 & BR 9507773 A & FI 9604763 A	1-14
Y	JP 10-501274 A (PROCTER AND GAMBLE CO.), 1998. 02. 03, 要約, 請求項1, 第5頁下第16-14行, & WO 95/33040 A1 & US 5451337 A1, & EP 763093 A1 & CN 1154139 A1 & BR 9507808 A	1-14



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-14に共通する事項は、「イネ由来ペルオキシダーゼ」のみである。

しかしながら、イネ由来ペルオキシダーゼは、文献「JP 7-91169 B」に開示されており、イネ由来ペルオキシダーゼを含んでいる組成物 (植物生長促進剤) も記載されている。

したがって、上記共通事項であるイネ由来ペルオキシダーゼは、先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2の第2文の意味における「特別な技術的特徴」であるとは認められず、請求の範囲1-14は、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。

請求の範囲1、及び3-9の一部は、イネ由来ペルオキシダーゼを利用した繊維染料移行防止に関する発明であり、請求の範囲2、及び3-9の一部は、イネ由来ペルオキシダーゼを利用した繊維染料漂白に関する発明であり、請求の範囲10-14は、繊維染料の移行防止・漂白に限定されないイネ由来ペルオキシダーゼを含有する組成物に関する発明である。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。